

酵母细胞转运正烷烃的研究

1. 热带假丝酵母 U_{3-21} 产乳化剂的条件试验

陈远童 庞月川 方心芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

微生物利用液态正烷烃发酵的第一步是将烷烃和水乳化, 烃水乳化之后, 正烷烃就易于被转运到细胞中^[1]。利用正烷烃发酵的酵母菌产生的乳化剂进入到发酵液中。

本文报道用分光光度计测定发酵液中乳化剂含量和热带假丝酵母 U_{3-21} 产生乳化剂的最

适条件。为进一步研究乳化剂的分离、提纯及其化学组成提供依据。

材料与 方法

一、菌株

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) U_{3-210}

二、材料

壬烷、癸烷、十一烷、十二烷、十三烷、十五烷和十六烷,其纯度均不低于95%,十四烷纯度为99%,其他试剂均为试剂级。

培养基(%): KH_2PO_4 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 玉米浆 0.15, 酵母膏 0.25, 尿素 0.2, 正烷烃 3.0 (V/V), 自来水配制。pH 5.0 左右, 培养基 8 磅 30 分钟灭菌, 尿素和正烷烃各自单独灭菌后, 接种前加入培养基中。

三、培养条件

将在麦芽汁琼脂斜面上培养二天的 U_{3-21} 菌接入 200 ml 盛有 20ml 10 波林的麦芽汁培养基的三角瓶中, 在 28℃ 旋转式摇床上 (200 转/分) 培养 24 小时, 以 5% 的接种量将此培养液接入 500 ml 盛有 25 ml 上述发酵培养基的三角瓶中, 培养 48 小时。

四、乳化剂的测定

发酵液离心 (4000 rPm) 15 分钟, 二次, 去残烃和菌体。用 721 型分光光度计, 在 500 nm 波长处, 1cm 光程比色杯测光密度, 离心过的空白培养基为对照。

五、菌体量的测定

将发酵液稀释至适当倍数, 以一份稀释液与二份溶媒 (乙醇: 正丁醇: 氯仿 = 10:10:1, V/V) 混合^[2], 摇匀后用 721 型分光光度计在 620nm 波长, 1cm 光程的比色杯中测定光密度。

六、残烃的测定

10 ml 发酵液置分液漏斗中, 用 4 倍体积的正己烷提取一次, 抽提液直接用 SP-2305 全型气相色谱仪分析^[3]。试验采用氢火焰离子化检测器, 固定液用 5% SE-30, 柱长 1.5M 内径 3 mm。用上海 101 白色担体 (60—80 目), 柱温 225℃, 气体流速氮气为 36ml/min, 氢气为 27 ml/min, 空气为 270ml/min。

结 果

一、乳化剂对烷烃和水乳化的作用

将热带假丝酵母 U_{3-21} , 在含有 3% 正十六烷的发酵培养基上培养 40 小时的培养液, 4000 rpm 离心去菌体和残烃。在小试管 (8×140mm)

中放入一定量蒸馏水和培养液, 再加入 1 ml 轻蜡 (C_{16-18} 混合正烷烃), 总体积为 5ml 用手摇动 30 秒钟, 放置、观察、记录乳状液破乳时间, 结果表明空白对照的破乳时间为 3 分钟, 加入 2 ml 培养液时为 240 分钟, 加入 4 ml 培养液时则长达 900 分钟。说明培养液的加入大大促进了正烷烃和水的乳化, 证明培养液中含有能乳化烃和水的物质—乳化剂。

二、测定乳化剂光密度的最适波长选择

把培养 40 小时的发酵液离心除去残烃和菌体, 在 400—580 nm 的不同波长测定其光密度。再将 pH 调至 8.0, 用石油醚提取乳化剂, 充分放置让其分层, 用上述波长再次测定提取乳化剂后的水溶液光密度。结果表明在 500nm 波长提取乳化剂后的发酵液, 色素的影响接近于零, 500nm 波长是灵敏而又能准确测定发酵液中乳化剂光密度的最适波长。在以下试验均采用此波长测定。

三、乳化剂与发酵时间的关系

我们试验了正十六烷浓度为 2%、3% 和 4% 时乳化剂与发酵时间关系的试验, 结果见图 1。

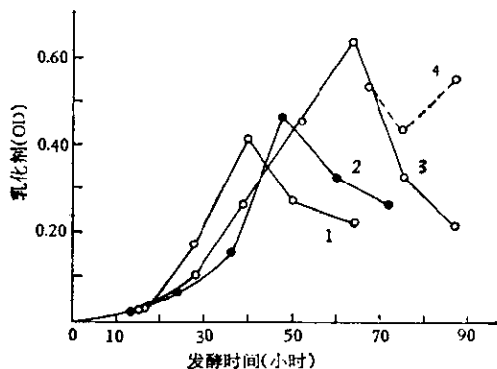


图 1 乳化剂产量与发酵时间关系

1 浓度为 2%, 2 浓度为 3%, 3 浓度为 4%,
4 为补加 2% 正十六烷

图 1 表明 2% 正十六烷时, 乳化剂高峰产量在 40 小时, 3% 正十六烷时, 高峰在 48 小时, 4% 正十六烷时在 64 小时左右。在试验 4% 正烷烃浓度时, 在乳化剂高峰产量过后, 于 67 小时补加 2% 正十六烷, 结果表明乳化剂量又有

回升。

四、乳化剂产量与发酵液中残烃的关系

在 25 ml 发酵培养基中,加入 3% 或 4% 正十六烷,培养不同时间后,取样测定乳化剂和残烃量,结果见图 2。

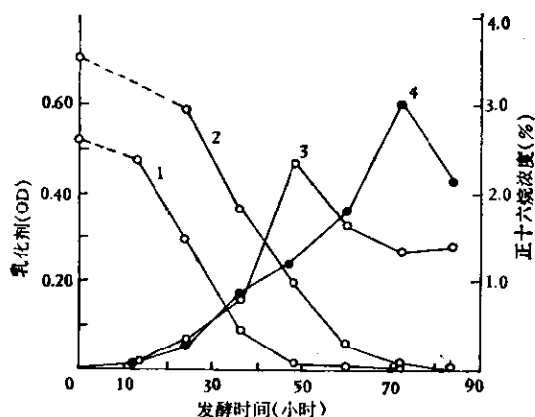


图 2 乳化剂产量与残烃的关系

1 为加 3%, 2 为加 4% 正十六烷, 3 为加 3%,
4 为加 4% 正十六烷的乳化剂

结果表明,乳化剂产量达到高峰时,也是发酵液中残烃接近于被用完之时。再延长时间,乳化剂逐渐降低产量。

五、不同碳链的正烷烃对 U_{3-21} 菌产乳化剂的影响

分别用 3% 的 C_{9-16} 的单一正烷烃作培养基的唯一碳源,发酵二天发现不同碳链的正烷烃用 U_{3-21} 菌株发酵,产生乳化剂量差别很大,见图 3。

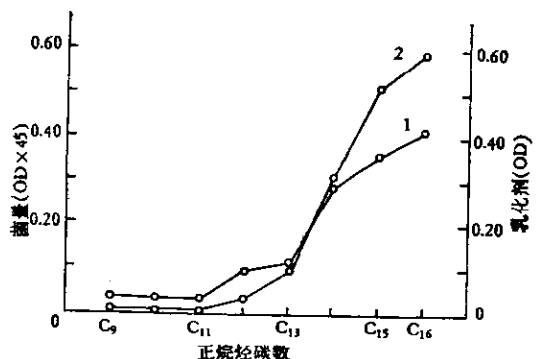


图 3 不同碳链正烷烃对 U_{3-21} 菌产乳化剂的影响

1 为菌体 OD, 2 为乳化剂

图 3 表明, C_{9-13} 的正烷烃产生的乳化剂很少,同时 U_{3-21} 菌生长也很差,尤其是 C_{9-11} 的正烷烃,几乎不产生乳化剂,所以 U_{3-21} 菌不能用它们作碳源生长。该菌以 C_{14-16} 正烷烃为碳源时,产生乳化剂多、生长好。

六、pH 对 U_{3-21} 菌产乳化剂的影响

我们用 0.5M KH_2PO_4 - $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 缓冲液配制培养基,每瓶中含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%,玉米浆和酵母膏各 0.1%,用 H_3PO_4 及 $NaOH$ 将 pH 分别调至 3.0—9.0。在 500 ml 三角瓶中装 25 ml 培养基,灭菌后接入种子液 5%,尿素 0.2%,正十六烷 3% 培养二天。测定乳化剂光密度,结果见图 4。

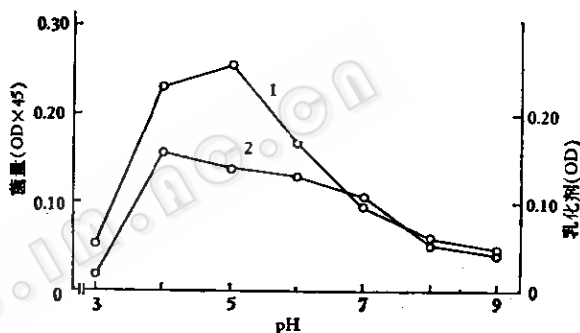


图 4 pH 对 U_{3-21} 菌产生乳化剂的影响

1 为菌体量, 2 为乳化剂

图 4 说明产乳化剂的最适 pH 为 4。

七、温度对 U_{3-21} 菌产乳化剂的影响

我们在培养基中加入 2% 正十六烷,接种后分别在 22—34℃ 温度之间培养 36 小时,测

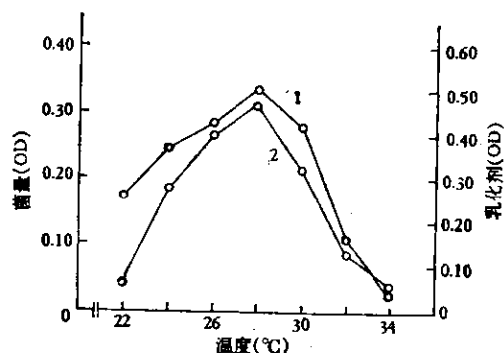


图 5 温度对 U_{3-21} 菌产乳化剂的影响

1 为菌体量, 2 为乳化剂

定其乳化剂产量,结果表明 28℃ 为产乳化剂的最适温度(图 5)。

八、通气量对 U_{3-21} 菌产乳化剂的影响

我们用 500 ml 三角瓶装不同体积培养基使其总体积分别为 15、20、25、30、40、50ml。培养二天,测定乳化剂量。结果表明装液量 25 ml 最适合产乳化剂。

讨 论

发酵液中产生的乳化剂量随正烷烃的消耗而逐渐增加,其产量达高峰时剩余的烷烃也不

多,约在 0.2% 以下。此后乳化剂开始逐渐消失,补加正烷烃后,乳化剂产量又开始回升。这种现象说明乳化剂可能是一种代谢的中间产物。 U_{3-21} 菌利用不同碳链的正烷烃,其生长和产乳化剂量不同,这是否与乳化剂形成的酶系有关,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Takashi Iguchi, Isao Takeda and Hiroshi Ohsawa: *Agr. Boil. Chem.*, 33 (11): 1657—1658, 1969.
- [2] Tadaatsu Nakahara, et al.: *J. fermentation Association*, 26: 413, 1968.
- [3] 陈远童等: *微生物学通报*, 10(4): 182—184, 1983.